

## RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

### Over het „laat optredend los” bij Goudsche kaas.

DOOR

F. W. J. BOEKHOUT en J. VAN BEYNUM.

(Ingezonden 6 Februari 1929).

Wanneer een Goudsche kaas na ongeveer een tweetal weken of langer een abnormale gasontwikkeling gaat vertoonen, kenbaar door het doffe geluid bij het beslaan met de platte hand of het bol gaan staan der vlakke zijden, zeggen de practici, dat de kaas het gebrek „laat optredend los” heeft. Door deze gasontwikkeling ontstaan in het kaasdeeg een groot aantal holten van een meer of minder ronden of onregelmatigen vorm, waardoor het een sponsachtig uiterlijk verkrijgt, en dikwijls grootere of kleinere scheuren (zie fig. 1 <sup>1</sup> en fig. 2 <sup>2</sup>), terwijl in sommige gevallen ze zoo sterk kan zijn, dat de korst barst en een gapende opening vertoont.

Men heeft dit later „los” worden der kaas aangeduid als „laat optredend los” om het te onderscheiden van het gewone „los”, dat, zooals bekend is, veroorzaakt wordt door de faecale bacteriën: *bact. lactis aerogenes* en *bact. coli-commune*. Een scherpe onderscheiding is dit echter niet, omdat bij de kaasbereiding, zooals die thans dikwijls in Zuidholland en Utrecht geschiedt, het niet is uitgesloten, dat ook beide genoemde bacteriënsoorten soms aanleiding kunnen geven tot z.g. „laat optredend los”.

Verscheidene boeren aldaar toch hebben bezwaar tegen het gebruik van zuursel, in welken vorm dan ook, hetzij als reincultuur, zure wei of z.g. „karnemelk” <sup>3</sup>), beweerend, dat dergelijke toevoegsels de qualiteit der kaas in ongunstigen zin beïnvloeden. Het gevolg hiervan is, dat ze geen zuursel

1) De kaas was gemaakt begin Maart 1928. Toen de partij 2 à 3 weken oud was, werd ze verkocht en opgeslagen in een pakhuis. De qualiteit was toen zeer goed. Daarna is in vele exemplaren het gebrek ontstaan. We ontvingen deze kaas op 26 April 1928.

2) Ontvangen op 14 Mei 1928. De ouderdom werd geschat op 4 à 5 weken. De kaas vertoonde toen het gebrek niet in erge mate maar was afkomstig uit een partij, waarvan de exemplaren steeds slechter werden. Om het gebrek wat sterker te maken is ze tot 22 Mei bij 18½° C. bewaard.

3) Deze „karnemelk” wordt in de praktijk in Zuid-Holland verkregen door een paar liter z.g. goede melk spontaan te laten zuren en daarna te karnen in een glazen karntje, zooals die te verkrijgen zijn in winkels voor huishoudelijke artikelen en die men wel eens ziet aanbevelen om uit de melk, voor huishoudelijk gebruik bestemd, boter te maken.

Dat dergelijke karnemelk en zure wei, indien ze afkomstig zijn van met *bact. lactis aerogenes* en *bact. coli-commune* besmette melk, meer kwaad dan goed doen behoeft geen betoog en het is ons door onderzoek van monsters van deze zuursels, afkomstig van Zuid-Hollandsche boerderijen, dan ook reeds vroeger gebleken, dat ze dikwijls *coli* en *aerogenes* bevatten.

2100673

gebruiken en dus het verloop der melkzuurgisting, welke in elke kaas intensief moet plaats grijpen om een goed product te verkrijgen, geheel en al afhankelijk wordt van den aard en de hoeveelheid der melkzuurbacteriën, welke toevallig in de melk geraken.

Dat men zich daardoor aan wisselvalligheden blootstelt is vanzelf sprekend; soms kan het goed gaan, maar men komt ook dikwijls voor verrassingen te staan, en één van die verrassingen is, dat de melkzuurgisting zeer zwak is of zoo goed als uitblijft. Hierdoor worden dan de bacteriën, welke uit melksuiker gas vormen, n.m. *bact. lactis aerogenes* en *bact. coli-commune* niet of niet voldoende onderdrukt, met als gevolg het optreden van „los”. Ten einde dan het gebrek te voorkomen zoekt men zijn heil in het gebruik van salpeter doch vergeet daarbij, dat onder deze omstandigheden de gasvorming niet overwonnen wordt maar naar later wordt verschoven.

Reeds in 1904 <sup>1)</sup> hebben OTT DE VRIES en een van ons aangetoond, dat de werking van salpeter tegen het los daarin bestaat, dat het de melksuiker beschut tegen een ontleding door *bact. coli-commune* en *bact. lactis aerogenes*.

Is alle salpeter door de bacterieele ademhaling verbruikt dan houdt die beschuttende werking vanzelf sprekend op en zou de melksuiker toch worden aangetast. Dit moet worden voorkomen en om dat te bereiken dient gezorgd te worden dat op dat tijdstip geen melksuiker meer in de kaas aanwezig is. Het eenige afdoende middel daarvoor is een intensieve melkzuurgisting, want in den tijd, dien de *coli* en *aerogenes* noodig hebben om de salpeter te verbruiken, kunnen de melkzuurbacteriën de melksuiker hebben omgezet. Schieten de melkzuurfermenten om een of andere reden, hetzij door zwakke virulentie of te gering aantal, daarin te kort dan wordt de nog aanwezige melksuiker door de *coli* en *aerogenes* aangetast, met als gevolg een meer of minder sterke gasontwikkeling. In zoo'n geval is met het gebruik van salpeter dus niets anders bereikt dan dat deze vertraagd optreedt.

Hoe groot die vertraging zal zijn hangt, zooals vanzelf spreekt, af van de sterkte der infectie met *coli* en *aerogenes*, van de hoeveelheid toegevoegde salpeter en van de hoeveelheid en hoedanigheid der melkzuurfermenten, terwijl ook de temperatuur, waarbij de kaas bewaard wordt, hierbij van invloed is. Gebruikt men dus geen zuursel en laat het aan het toeval over of er al dan niet een goede melkzuurgisting in de kaasmassa zal plaats grijpen, dan is het begrijpelijk dat men, bij gebruik van salpeter, dikwijls meent met „laat optredend los” te doen te hebben, terwijl het inderdaad niet anders is dan een vertraagde „rijzer”. Fig. 3 geeft een dergelijk geval te zien. Deze kaas was afkomstig uit Utrecht en werd ons door den zuivelconsulent toegezonden als een geval van „laat optredend los”. In de zijanten ervan werd nog een vrij sterke melksuikerreactie geconstateerd, hetwelk reeds wees op een slecht doorgevoerde melkzuurgisting, waarmede in overeenstemming was, dat de aanwezige melkzuur-

1) Verslag over het jaar 1903 der Vereeniging tot Exploitatie eener Proefzuivelboerderij te Hoorn, blad. 79 (verschenen 1904).

bacteriën grootendeels uit zeer zwak virulente stammen bestonden. Een cultuur op alkalische Löfflersche gelatine vertoonde een ongekend aantal koloniën van bact. coli-commune (zie fig. 4). Andere gasvormende bacteriën, zooals boterzuurbacteriën en die van de normale gasvorming, waren niet aan te toonen, zoodat de kaas niets anders was dan een vertraagde „rijzer”. Dat in zoodanig geval het gebruik van goed zuursel uitkomst zou brengen behoeft hier geen nader betoog.

Uit het voorgaande blijkt, dat om een scherpere definitie van het „laat optredend los” te geven, gevallen als bovenstaande buiten beschouwing dienen gelaten te worden en dus niet alleen met den tijd waarop de gasontwikkeling zich vertoont moet rekening worden gehouden, maar ook met andere factoren.

Een eerste vereischte daarbij is, dat de gasontwikkeling niet gaat ten koste van de melksuiker, maar dat deze haar oorsprong vindt in de ontleding der melkzure kalk, dus de stof die ontstaat door de chemische wisselwerking tusschen het door de melkzuurbacteriën uit de melksuiker gevormde melkzuur en de kalkverbindingen van de wrongel. Dit sluit al dadelijk in zich dat voorop gesteld wordt, dat de melkzuurgisting goed verlopen zij, zoodat alle in de versche kaas aanwezige melksuiker totaal is omgezet in melkzuur; naast een zeer geringe hoeveelheid azijnzuur.

Wanneer men nu aan de vooropstelling vasthoudt dat de melkzure kalk de grondstof vormt voor de gasontwikkeling — en een ander geval is niet wel denkbaar omdat er in een *goed* gemaakte kaas geen andere stoffen voorkomen, welke daarvoor zouden kunnen dienen — dan zijn er tot dusver twee bacteriënsoorten bekend welke als gasvormers in aanmerking komen en wel: boterzuurbacteriën en de bacteriën van de normale gasvorming in kaas.

Beide zijn door OTT DE VRIES en een van ons reeds vroeger beschreven <sup>1)</sup> en kan dus, wat hare isolatie en eigenschappen betreft, naar deze publicaties verwezen worden.

In Juni 1926 kwamen wij, door bemiddeling der Coöperatieve Producenten Handelsvereniging te Gouda, in het bezit van een paar stukken kaas, genomen uit een tweetal kazen, welke zoo hevig het gebrek „laat optredend los” hadden, dat de korst over een groot gedeelte gebarsten was.

Van een dezer kazen gaven de culturen op weigelatine, Löfflersche gelatine en moutgelatine geen afwijkingen te zien; van de andere vertoonde de flora echter enkele afwijkende vormen waaronder, op de Löfflersche gelatine, een paar kolonies van bact. coli-commune. Daar de gasontwikkeling in deze kazen een massa mooie ronde gaten had doen

1) Jaarverslagen der Vereeniging tot Exploitatie eener Proefzuivelboerderij te Hoorn:

„Over een tweetal kaasgebreken”, Jaarverslag 1909, bladz. 84;

„Over het gebrek „Knijpers” in Edammer kaas”, Jaarverslag 1911, bladz. 81;

„Over het gebrek „Knijpers” in Edammer kaas”, Jaarverslag 1912, bladz. 92;

„De normale gasvorming in Kaas”, Jaarverslag 1915, bladz. 71;

„Het gebrek „knijpers” in Edammer kaas”, Jaarverslag 1915, bladz. 97.

De publicaties zijn ook verschenen in de: Verslagen van Landbouwkundige Onderzoekingen der Rijkslandbouwproefstations, n<sup>o</sup>. XI (1912), bladz. 5, n<sup>o</sup>. XIV (1913), bladz. 9, n<sup>o</sup>. XX (1917), bladz. 71, en n<sup>o</sup>. XXI (1917), bladz. 14.

ontstaan en een reuk naar boterzuur niet was waar te nemen, werd vermoed, dat de gisting veroorzaakt was geworden door de bacteriën, beschreven in de publicatie over: de normale gasvorming in kaas. Op de wijze als daar vermeld werd toen getracht de isolatie ervan te krijgen.

Hoewel er nu in de buisjes met pepton-calciumlactaat-oplossing een flinke gisting optrad toen met kaas was geënt, toch gelukte het niet de bedoelde bacteriën af te zonderen, ondanks de vele pogingen daartoe gedaan. Door dit negatief resultaat bleek dat de oorzaak der gisting anders moest liggen en de mogelijkheid bestond dat een anaerob organisme in het spel was. Het laatste gedeelte der isolatie bestaat namelijk daarin, dat de uitgegiste vloeistof uitgestreken wordt op een gelatine, bereid met de pepton-calciumlactaat-oplossing, zoodat dan het kweken zonder afsluiting der lucht geschiedt, hetgeen voor dit geval foutief kon zijn geweest.

Ten einde de juistheid van deze veronderstelling te toetsen werd de vloeibare pepton-calciumlactaat-gelatine geënt met de uitgegiste vloeistof en daarna gegoten in een reageerbuis tot deze er bijna geheel mede gevuld was. Na stolling werden deze diepe laag culturen in een thermostaat bij 21° C. geplaatst.

Het experiment had thans een gunstig verloop. Na een 40-tal dagen bemerkten we eenige gasbellen. Deze werden op den duur grooter en namen ook in aantal toe. De kwalitatieve samenstelling van het gas werd nagegaan en kon daarin koolzuur en waterstof worden aangetoond.

Onder het belangrijk aantal koloniën, dat zich in de gelatine ontwikkelde had, waren ook eenige op te merken, welke zich van de overige onderscheidden door hunne grootere afmetingen. Deze bleken te bestaan uit sporenvormende staven en herinnerden sterk aan boterzuurbacteriën. Ten einde dit nader te bevestigen werden ze gebracht in buisjes met neutrale Löfflersche bouillon en  $\frac{1}{2}$  % galactose, welke werden luchtledig gepompt en toegesmolten op de wijze als medegedeeld in de publicatie van 1911: „Over het gebrek Knijpers in Edammerkaas” en daarna verhit op 80° C. gedurende 5 minuten. Vervolgens werden de buisjes bij 21° C. geplaatst.

Een 5 à 6 dagen later trad gisting op, na beëindiging waarvan ze werden geopend. De vloeistof riekte naar boterzuur, terwijl de bacteriën beweeglijke staven waren. Verder bleek, dat er na 3 weken in de bouillonculturen sporenvorming plaats greep. In gelatine van neutrale Löfflersche bouillon +  $\frac{1}{2}$  % galactose ontstonden koloniën, welke het aspect vertoonden van gestolde wasdruppels en had tevens gasvorming plaats, welke kenbaar was aan de zich vormende blazen. Soms was deze zoo krachtig, dat de gelatine vaneen werd gereten. Al deze kenmerken toonden aan, dat de bacteriën boterzuurfermenten waren.

Toen eenmaal dus vastgesteld was, dat beide kazen deze bevatten, moest nagegaan worden of we hier met een paar uitzonderingsgevallen te maken hadden, dan wel of kazen met „laat optredend los” altijd besmet waren met boterzuurbacteriën. Was dit laatste het geval, dan zou tevens de oorzaak van het gebrek verklaard zijn.

Een vijftal kazen, welke wij ontvingen van de Zuivelconsulenten voor Utrecht en Zuidholland, waarvan vier met „laat optredend los”, werden

daarom op boterzuurbacteriën onderzocht, op de wijze als aangegeven in de publicatie over „Knijpers” van 1911.

De andere kaas vertoonde wel niet het groot aantal ronde gaten, dat een kenmerk is van het gebrek, maar daarin had toch een gasontwikkeling plaats gegrepen. Ze bezat namelijk in het midden één groote ronde holte van  $\pm 50$  c.c. inhoud, met daarnaast mooie ronde gaten door het gansche zuivel verspreid. Het gas had zich dus grootendeels op één plek vergaderd in plaats van zich regelmatig door de geheele massa heen af te zetten. Wat daarvan de reden is valt moeilijk te zeggen, doch het verschijnsel, hoewel zeldzaam, komt ook bij Edammers een enkele maal voor. Fig. 5 geeft een kaas te zien met een dergelijke groote opening, zij het dan van veel geringer afmetingen dan bovenbedoelde. Al de vijf voornoemde kazen nu bleken boterzuurbacteriën te bevatten in meer of minder groot aantal.

Daar deze laatste dus ook een belangrijke rol spelen in de Goudsche kaasbereiding, zijn hare eigenschappen, voor zoover deze in de vroeger genoemde publicaties niet tot haar recht waren gekomen, nader onderzocht. Hiervoor zijn eenige stammen gebruikt, afkomstig uit verschillende Goudsche kazen en één Edammer kaas.

Bij de vroegere onderzoekingen was als voedingsmedium neutrale Löfflersche bouillon genomen, waaraan  $\frac{1}{2}$  % galactose was toegevoegd. Hoewel de bacteriën zich hierin uitstekend kunnen ontwikkelen en het dus voor de isolatie en voortkweeking de aangewezen voedingsbodem is, zoo geven de reacties, welke ze daarin te voorschijn roepen, toch geen juist beeld van hetgeen in de kaas geschiedt, omdat in deze vloeistof de koolstofbron uit suikers bestaat, terwijl die in de kaas de melkzure kalk is. Om dus eene betere vergelijking te kunnen maken, zou het kweken moeten plaats hebben in een medium, waarin geen suikers doch melkzure kalk voorkomt.

Zooals boven medegedeeld ontstond er in de pepton-calciumlactaat-oplossing een intensieve gisting, wanneer deze met de kaas werd geënt, hetgeen ons deed vermoeden daarin het gewenschte voedingsmedium te hebben gevonden. Toen echter de vloeistof geënt werd met reïncultures van boterzuurbacteriën, ontstond er nimmer gisting, zelfs niet na 85 dagen, en al was de reactie zuur, neutraal of zwak alkalisch. Dit laatste is van belang omdat het later onderzoek uitwees, dat de reactie der voedingsvloeistoffen een grooten invloed heeft op den groei.

Er bestond dus een tegenspraak wat de uitkomst betrof tusschen beide proeven; aan de eene zijde gisting wanneer met gemengde cultuur, te weten kaas, was geënt, aan den anderen kant geen gisting, indien dit met een reïncultuur geschiedde. Voor dit verschil in gedrag der boterzuurbacteriën kon alleen een verklaring gevonden worden door aan te nemen, dat andere in de kaas aanwezige bacteriën invloed uitoefenden en daarbij dachten wij in de eerste plaats aan *bact. coli-cummune*.

Bij de isolatie der bacteriën van de normale gisting uit kazen was ons namelijk gebleken, dat een groot deel der koloniën van de streepcultures op de pepton-calciumlactaat gelatine bestonden uit die van *coli*. Dit behoeft geen verwondering te wekken; in elke kaas komt haast vanzelf sprekend deze laatste voor, hoewel bij een goede melkbehandeling in zoo'n gering aantal, dat deze op de gewone wijze niet aangetoond worden. Wordt echter

de pepton-calciumlactaat-oplossing, welke een selectieven voedingsbodem voor coli vormt, met een voldoende hoeveelheid kaas geënt, dan zullen de enkele daarin aanwezige exemplaren zich ongehinderd kunnen vermeerderen en heeft er dus ophooping plaats, waarvan het gevolg is, dat een groot aantal koloniën daarvan zich in de streepcultures ontwikkelt.

Met een tweetal colistammen, geïsoleerd uit Goudsche kaas, werden nu eenige proeven genomen om te zien of deze bacteriesoort werkelijk van invloed was bij de gisting der boterzuurfermenten in de pepton-calciumlactaat-oplossing. Ze werden daartoe, afzonderlijk en in combinatie met een boterzuurbacterie, gebracht in buisjes met die oplossing, welke daarna luchtledig werden gepompt en toegesmolten en bij 21° C. geplaatst. In het geheel werden zes verschillende stammen van boterzuurbacteriën gebruikt. Het resultaat was, dat de buisjes, waarin ook boterzuurbacteriën aanwezig waren, alle gisting vertoonden, welke begon tusschen 4 en 9 dagen en ongeveer een maand lang aanhield, terwijl de buisjes met coli gedurende dien tijd geen van alle gistten. Daar elk der twee gebruikte colistammen de boterzuurbacteriën dus in staat stelden de gisting in de pepton-calciumlactaat-oplossing te voorschijn te roepen, werd nagegaan of deze eigenschap sporadisch dan wel algemeen bij coli voorkwam. Hierom werd de proef nog eens herhaald met een willekeurige coli, welke uit water geïsoleerd was. Ook hier trad eenzelfde verschijnsel op, met dien verstande, dat van de 4 gebruikte stammen boterzuurbacteriën, waarvan 3 afkomstig waren uit Goudsche kaas en 1 uit een Edammer, er slechts twee, geïsoleerd uit Goudsche kaas, gistten. Deze vertoonden gasbellen na 7 en 8 dagen en zetten dit voort gedurende 14 en 23 dagen. Een eigenaardig verschijnsel, dat we trouwens later meermalen zagen optreden, was hierbij, dat één der boterzuurfermenten na 10 dagen ophield met gisten, om dit 5 dagen later weer voort te zetten gedurende nog 4 dagen.

Behalve coli bleek ook nog *bact. lactis aerogenes* de stimuleerende werking op de boterzuurfermenten te hebben. Een *lactis*-stam, geïsoleerd uit kaas met dezelfde 4 boterzuurfermenten samengebracht, riep eveneens gisting, doch alleen met die twee zelfde, te voorschijn na 11 en 51 dagen, terwijl de duur er van 26 en 11 dagen bedroeg.

Hoe men zich den invloed der coli moet voorstellen is niet recht duidelijk. De opvatting als zoude de pepton in het algemeen geen bruikbare stikstofbron zijn voor de boterzuurfermenten, is niet houdbaar, omdat in een oplossing van: 2 % pepton,  $\frac{1}{2}$  % keukenzout,  $\frac{1}{2}$  % dextrose en  $\frac{1}{2}$  % galactose in gedestilleerd water, die zwak alcalisch is gemaakt, wel een flinke gisting ontstaat. Voor een zestal stammen, welke wij gebruikten, begon deze na 10 à 12 dagen en duurde van 4 tot 17 dagen. Men zou dus alleen kunnen zeggen, dat de pepton onbruikbaar is als stikstofbron, wanneer de boterzuurbacteriën voor koolstofbron alleen over melkzure kalk kunnen beschikken. De werking der coli zou dan daarin kunnen bestaan, dat de pepton ontleed wordt zoodanig, dat stikstofverbindingen ontstaan, welke voor boterzuurfermenten wel assimileerbaar zijn bij aanwezigheid van calciumlactaat.

Wij hebben getracht dit nader aan te toonen door cultures van coli in de pepton-calciumlactaat-oplossing, aerob of anaerob gekweekt, welke door verhitting of filtratie door een Chamberlandfilter gesteriliseerd waren, te

enten met boterzuurfermenten. Gebruikt werden coli-cultures, welke 1, 2, 4, 7, 14, 21 en 28 dagen oud waren en, daar door de filtratie het neerslag uit de pepton-calciumlactaat-oplossing verdwenen was, werd soms wederom bikaliumphosphaat toegevoegd, terwijl tevens rekening werd gehouden met de reactie.

In de gefiltreerde cultures ontstond zelfs na 2 maanden geen gisting door de zes gebruikte stammen der boterzuurfermenten, terwijl bij de verhitte cultures ook na goed 2 maanden en 85 dagen door deze stammen geen gasontwikkeling te voorschijn werd geroepen, behalve dan in een paar gevallen, waarbij in een 14 dagen en een 3 weken oude colicultuur door een paar stammen, bij een zwak alkalische reactie, na respectievelijk 46, 38 en 64 dagen een geringe gisting optrad.

Hoewel het resultaat van deze proeven misschien eenige wijziging kan geven is er, zooals ze daar liggen, echter geen bepaalde conclusie uit te trekken.

Toen nu gebleken was, dat de pepton-calciumlactaat-oplossing geen bruikbaar voedingsmedium was en ook de vervanging van de vleeschpepton door caseinepepton geen uitkomst bood, werd naar een ander gezocht, dat daarvoor wel geschikt zou zijn.

Het gelukte ons dit te vinden door in plaats van een peptonoplossing vleeschbouillon met  $\frac{1}{2}$  % keukenzout <sup>1)</sup> te nemen en dan daaraan toe te voegen 0.2 % bikaliumphosphaat en 2 % melkzure kalk <sup>2)</sup>. Door de wisselwerking, welke tusschen het bikaliumphosphaat en de melkzure kalk plaats grijpt, ontstaat een vrij sterke zure oplossing, waarvan de waterstofexponent 4.96 kan bedragen. Zooals we zien zullen ligt deze ver boven de grens welke voor de meeste boterzuurfermenten in dit medium toelaatbaar is en dient daarom de bouillon, na toevoeging van beide genoemde verbindingen, wederom geneutraliseerd te worden <sup>3)</sup>. Geheel suikervrij is de lactaatbouillon evenwel niet, daar in vleesch altijd sporen dextrose voorkomen. Deze bleken nochtans niet voldoende om eenigszins intensieve gasvorming te doen ontstaan. In neutrale vleeschbouillon met 0.5 % keukenzout, waaraan 0.2 % dikaliumphosphaat was toegevoegd, trad namelijk na enting met verschillende stammen wel een lichte groei op, doch was geen of een slechts zeer zwakke gisting waarneembaar, terwijl de vloeistof maar zwak naar boterzuur riekte<sup>4)</sup>. Met de neutrale- of zwak alkalische lactaatbouillon

1) Deze vleeschbouillon wordt aldus bereid. Een pond mager rundvleesch waarvan alle vet is verwijderd, wordt fijngemalen en daaraan toegevoegd  $\frac{1}{2}$  liter gedestilleerd water en 5 Gr. NaCl, waarna het mengsel gedurende 3 uur in een stoompot verhit wordt. Vervolgens wordt gefiltreerd door een nat filter; geneutraliseerd op lakmoes en zoonoodig nogmaals gefiltreerd, waarna wordt aangevuld tot 1 liter met gedestilleerd water.

2) Hoewel de melkzure kalk uit den handel goed bruikbaar is, dient er toch op gewezen, dat deze iets boterzure kalk bevat. Voor sommige gevallen kan het daarom aanbeveling verdienen uit te gaan van het zuivere praeparaat, gemaakt uit gedestilleerd melkzuur.

3) Dit neemt evenwel niet weg, dat wanneer de omstandigheden, wat  $P_H$  en boterzuurfermenten betreft, toevallig gunstig zijn, ook nog wel gisting kan optreden zonder deze neutralisatie, hetgeen bij onze proeven ook enkele malen het geval is geweest. Zoo trad soms gasvorming op na 23, 29 en 32 dagen.

4) Dat deze sporen dextrose ook geen impuls vormen voor de gisting der melkzure kalk bleek wel daaruit, dat in de pepton-calciumlactaat-oplossing, al of niet geneutraliseerd, evenmin gisting optrad als er 0,01 % dextrose aan was toegevoegd.

daarentegen ontstond in verreweg de meeste gevallen een flinke gisting, welke aanving tusschen 5 en 28 dagen, in een enkel geval na 54 dagen.

Het is hierbij opvallend, dat de verschillende bouillons zich in dit opzicht niet eender gedragen; in de eene lactaat-bouillon toch treedt spoediger groei en gasontwikkeling op dan in de andere. Hetzelfde ziet men in geringer mate ook gebeuren in bouillons met dextrose en galactose. Hoewel de boterzuurfermenten volgens onze ervaring, wat hun groei betreft, tot de meest grillige bacteriën behooren, <sup>1)</sup> zal toch in hoofdzaak dit verschijnsel te wijten zijn aan verschillen in de samenstelling van het rundvleesch.

Daar het van belang was te achten de wisselvallige werking der bouillon uit te schakelen, is, voor zoover ons mogelijk was, nagegaan welke extractiestoffen van het vleesch door de bacteriën als stikstofbron werden benut. Een drietal ervan, namelijk Kreatine, Urinezuur en Guanidine, zijn door ons in die richting onderzocht, maar gaven niet het gewenschte resultaat. Misschien zou echter een uitgebreider onderzoek in deze meer licht kunnen verschaffen.

Reeds in de publicatie over knijpers van 1911 is medegedeeld, dat de gevoeligheid der boterzuurfermenten ten opzichte van melkzuur verschillend is. Als voedingsmedium werd daarbij gebruikt neutrale Löfflersche bouillon +  $\frac{1}{2}$ % galactose. Dit medium wijkt evenwel vrij sterk af van de neutrale lactaat bouillon en daarom was het vermoeden zeker gewettigd, dat in dit laatste milieu de hoeveelheid melkzuur, noodig om den groei te verhinderen, anders zou zijn. Met het oog hierop zijn eenige proeven genomen, waarvan de resultaten zijn samengebracht in tabel I.

Zie tabel I op bladz. 33.

De duur der gisting was verschillend en eenige regelmaat was daarin niet te herkennen. In de neutrale Löfflersche bouillon met  $\frac{1}{2}$  % galactose liep ze ongeveer van 4 tot 7 dagen, doch ook wel eens langer, terwijl in de lactaat-bouillon de gisting van de stammen 1 en 2 van 8 tot 12 dagen aanhield en van 4 slechts 2 à 3 dagen. Stam 3 daarentegen vertoonde in de lactaat-bouillon het typisch verschijnsel van intermitterende gisting, dat we bij stam 2 in de mengcultuur met een coli uit water afkomstig, ook hadden waargenomen. De tijd, gedurende welke de gisting latent was, strekte zich in dit geval echter over een grootere periode uit en bedroeg ongeveer een maand.

Beschouwen we de tabel nader dan zien we ook nu weer, dat er verschil in gevoeligheid ten opzichte van melkzuur bestaat. In de Löfflersche bouillon stopt bijv. stam 4 bij  $P_H = 5.61$ , de stammen 2 en 3 bij 4.71 en 4.72 en stam 1 bij 4.56. Bij de lactaat-bouillon vinden we als grens voor stam 4:  $P_H = 6.22$ , voor stam 3: 5.41, voor stam 1: 5.27 en voor stam 2: 5.15; alle getallen die vrij wat hooger liggen, zoodat de boterzuurbacteriën in de Löfflersche bouillon tegen een hoogere waterstofionenconcentratie bestand

1) Met het oog hierop werden bij al onze proeven ter contrôle dan ook telkens cultures van de boterzuurfermenten aangelegd in Löfflersche bouillon +  $\frac{1}{2}$  % galactose, dat ons des tijds gebleken was de meest betrouwbare voedingsbodem te zijn. Al de gebruikte stammen hebben daarin na ongeveer een week altijd gisting te voorschijn geroepen.



TABEL I.

c.c. Melkzuur per 30 c.c. neutrale Löff- lersche bouillon met 1/2 % galactose.	Aantal dagen waarna gisting optrad.				P <sub>H</sub> der vloeistof 1).	c.c. Melkzuur per 30 c.c. neutrale lactaat- bouillon.	Aantal dagen waarna gisting optrad.				P <sub>H</sub> der vloeistof 1).
	Boterzuurferment.						Boterzuurferment.				
	1.	2.	3.	4.			1.	2.	3.	4.	
0.15 1/10 n.	8	6	8	6	(4) 5.61	0.15 1/10 n.	7	10	7	10	(4) 6.22
0.3 "	9	8	8	7		7	9	11	10		
0.45 "	8	9	9	7		6	9	gebroken	9		
0.6 "	9	8	9	7		7	9	11	nog niet na 2 mnd.		
0.75 "	8	8	9	7		9	10	7	"		
0.9 "	9	8	10	7		7	8	11	"		
1.05 "	9	8	13	7		6	10	11	"		
1.2 "	9	8	13	8		7	10	13	"		
1.35 "	9	8	13	7		10	10	13	"		
1.5 "	10	8	11	9		11	8	14	"		
0.15 n.	7	6	6	8		22	25	31	"		
0.3 "	10	11	13	nog niet na 2 mnd.		29	37	64	"		
0.45 "	21	21	39	"		33	37	nog niet na 64 dag.	"		
0.6 "	28	39	30	"		nog niet na 63 dag.	35	"	"		
0.75 "	46	nog niet na 2 mnd.	nog niet na 2 mnd.	"		"	nog niet na 65 dag.	"	"		
0.9 "	nog niet na 2 mnd.	"	"	"	"	"	"	"			
1.05 "	"	"	"	"	"	"	"	"			
1.2 "	"	"	"	"	"	"	"	"			
1.35 "	"	"	"	"	"	"	"	"			
1.5 "	"	"	"	"	"	"	"	"			

<sup>1)</sup> Electrometrisch bepaald.

zijn dan in de lactaat-bouillon. Dat ze in beide voedingsbodems, bij gelijke (stam 2) of ongeveer gelijke (stam 1 en 3) melkzuurconcentratie en bij ongelijke waterstofionenconcentratie, in hun groei belet worden, toont wel aan, dat nog andere factoren dan deze laatste daarbij van invloed zijn. Hierbij kan bijv. ook het niet-gedisassocieerde melkzuur een rol spelen.<sup>1)</sup>

Dat de grenswaterstofexponenten van diverse boterzuurfermenten zoo verschillend zijn brengt met zich, dat bij gelijken zuurgraad der kaas in het eene geval „laut optredend los” kan ontstaan en in het andere geval niet.

Als men verder nagaat dat bij de Goudsche kaasbereiding de watertoevoeging meerendeels vrijwel systeemloos geschiedt en juist deze van grooten invloed is op den zuurgraad, welken de kaas zal verkrijgen, zoo is het te begrijpen, dat men in de praktijk dikwijls voor oogenschijnlijk onverklaarbare gevallen komt te staan.

Behalve dat ze daarin licht verschaffen, geven de waterstofexponenten ook nog een inzicht in de omzettingen, welke de boterzuurfermenten veroorzaken. Bij een toevoeging van 0.45 c.c. n melkzuur aan de 30 c.c. neutrale lactaat-bouillon groeiden alleen nog de stammen 1 en 2 en had de vloeistof na 64 dagen van af de enting gerekend een  $P_H$  respectievelijk van 6.65 en 6.54. De buis geënt met stam 3, waarin geen groei was opgetreden, en die dus als de oorspronkelijke lactaat-bouillon kon gelden, had toen daarentegen een  $P_H$  van 5.41, zoodat een sterke stijging in de geënte buisjes had plaats gegrepen.

Hetzelfde ziet men gebeuren bij de lactaat-bouillon met 0.6 c.c. n melkzuur. De stam 2, welke gegroeid had, leverde na 63 dagen van af de enting een  $P_H$  van 6.72, terwijl de met stam 1 geënte vloeistof, waarin geen groei was ontstaan, toen een  $P_H$  van 5.27 bezat. Uit deze getallen blijkt overtuigend, dat de boterzuurfermenten een verlaging van den zuurgraad der lactaat-bouillon teweegbrengen of m.a.w. daarin neutraliseerende stoffen doen ontstaan, en men zal in de eerste plaats daarbij wel kunnen denken aan calciumcarbonaat als ontledingsproduct der melkzure kalk, b.v. volgens de formule:  $2(C_2H_4OHCOO)_2Ca + H_2O = 4H_2 + 3CO_2 + CaCO_3 + (C_3H_7COO)_2Ca$ .

Na het voorgaand onderzoek diende vervolgens nog aangetoond te worden, dat de boterzuurfermenten werkelijk in staat waren het gebrek te voorschijn te roepen. In verband met hetgeen bij onze onderzoekingen omtrent „knijpers” gebleken was, was dit wel als vaststaand aan te nemen, doch volledigheidshalve meenden we dit nog proefondervindelijk te moeten aantonen.

We besloten daartoe Goudsche kazen te maken van  $\pm 10$  pond, een gewicht, dat ook gebruikelijk is in de praktijk, zoodat de resultaten direct te vergelijken waren met de verschijnselen, zooals die op de boerderijen optreden. Gekaasd werd in twee tobben, waarvan één voor de proefkazen en één voor de contrôlekazen. Met het oog op de bewerking werd in elke bak 100 liter volle melk verkaasd, waaruit dan telkens twee kazen werden bereid.

1) Zie o.a. W. VAN DAM, Opstellen over moderne zuivel-chemie, 1922 en B. J. HOLWERDA, Bijdrage tot de kennis der chemie van de melkzuurgisting (dissertatie) 1921.

Het was practisch ondoenlijk deze hoeveelheid melk op aseptische wijze te verkrijgen en tot pasteurisatie wenschten we niet te besluiten, met het oog op eventueel broos worden van het zuivel, zoodat we op melk waren aangewezen, welke op de gewone wijze gemolken was, zij het dan met betrachting van grootere zindelijkheid. In den beginne hadden wij met eenigen tegenspoed te kampen. Onze proeven vielen namelijk in de stalperiode en de koeien werden toen juist met ingekuuld gras gevoerd, een product, dat in groote mate boterzuurbacteriën bevat. Zoolang de kazen in de koude bleven ( $\pm 9^{\circ} \text{C.}$ ) was er weinig aan te bemerken, doch niet zoodra waren ze op een eenigszins hoogere temperatuur gebracht ( $17-18^{\circ} \text{C.}$ ) of na eenige dagen begonnen deze boterzuurbacteriën hunnen ongewenschten invloed te doen gelden en trad er gasvorming op in alle kazen, zoodat soms reeds na 9 dagen het kaasdeeg bij het doorsnijden een massa ronde oogen vertoonde. Uit zoo'n kaas konden dan gemakkelijk boterzuurbacteriën geïsoleerd worden. Fig. 6 vertoont een tweetal van dergelijke kazen, <sup>1)</sup> waaraan bij de bereiding geen cultures van boterzuurbacteriën waren toegevoegd.

Bij het gebruik van persvoer dient men dus wel te bedenken, dat dit voorzichtigheidshalve niet geschiede in die maanden der stalperiode, waarin de kans bestaat, dat er warmere dagen optreden, doch dat men daarvoor November tot en met Februari kiest. Dit klemmt te meer, omdat men geneigd is om, met het oog op het verhoogen van de melkgift het persvoer juist in den voor- en nawinter te voederen. Wat voor persvoer geldt is eveneens van toepassing op die voederstoffen, waarin gemakkelijk een boterzuurgisting kan optreden, zoo bijv. natte pulp en aardappelvezels, welke laatste veel in Zuidholland schijnen gevoerd te worden en die, zooals thans de fabricage is ingericht, reeds op de aardappelmeelfabrieken een boterzuurgisting doormaken.

Toen dus de ongunstige invloed van het persvoer zich had doen kennen, zijn de benoodigde koeien in een afzonderlijken stal gebracht en werd niet alleen het voeren met ingekuuld gras uitgesloten, maar werd ook het daar werkzame personeel opgedragen op geen enkele wijze daarmede in aanraking te komen. Tevens werden vóór het melken de handen gewasschen, de uiers goed afgewreven met een schoonen handdoek en schoone werkpakken aangetrokken. De op die wijze verkregen melk was, hoewel ze uit den aard der zaak niet aan hooge eischen voldeed, voor ons doel voldoende geschikt. Voor elke proef werden  $\pm 200 \text{ L.}$  gebruikt, welke gelijkelijk werden verdeeld, en was de eene helft bestemd voor de twee proefkazen en de andere voor de twee contrôlekazen. Aan ieder der beide tobben werd 100 c.c. zuursel, 30 c.c. stremsel en 1 à 2 c.c. kleursel toegevoegd en in één ervan eenige gesmolten gelatineculturen van één boterzuurferment uit de Goudsche kazen geïsoleerd. Het aantal gelatineculturen wisselde af van 2 tot 4 stuks, hetgeen verband hield met het meer of minder dicht bezet

1) Eén er van is na 20 dagen bij lage temperatuur te hebben gestaan gedurende 8 dagen bij  $17-18^{\circ} \text{C.}$  bewaard en toen gefotografeerd. De andere is direct na het pekelen gedurende 8 dagen bij  $15-17^{\circ} \text{C.}$  gezet en daarna 14 dagen bij  $17-18^{\circ} \text{C.}$ , vervolgens gefotografeerd.

zijn met koloniën. Waren ze voor hun doen dicht bezaaid, dan werden 2, anders meerdere culturen, genomen. De culturen bevatten ieder ongeveer 8 c.c. gelatine.

De bewerking der melk geschiedde vervolgens geheel op de wijze als bij de Goudsche kaasbereiding in zwang is, terwijl voor het opwarmen gekookt leidingwater van  $\pm 100^{\circ}$  C. in de tobbe werd gegoten. Daar de proeven genomen werden in den wintertijd, in een tijd dus, dat een temperatuur heerscht, die te laag is voor de boterzuurgisting, werden de kazen na het pekelen geplaatst in een kast, waarvan de temperatuur geregeld was op  $\pm 18\frac{1}{2}^{\circ}$  C.

In het geheel zijn drie stammen boterzuurfermenten gebruikt en alle kazen daarmee gemaakt, vertoonden het „laat optredend los”, terwijl de contrôlekazen daarentegen geen afwijkingen vertoonden. De fig. 7, 9, 11 en 11a geven de proefkazen weer, terwijl 8, 10 en 12 de overeenkomstige contrôlekazen voorstellen. De tijd, waarin het gebrek optrad, liep uiteen van 6 tot 13 dagen, hetgeen o.a. verband hield met het verschil in virulentie van de bacteriën <sup>1)</sup>. Dat de melk voldoende zuiver was geweest, bleek wel daaruit, dat in de contrôlekazen op de gewone wijze geen coli-bacteriën waren aan te toonen.

Evenals bij de fig. 1 en 2 ziet men ook bij de proefkazen, dat het gas zich in hoofdzaak afzet in het middengedeelte der kaas, terwijl het randgedeelte daarvan weinig of niets bevat. Dit verschijnsel wordt veroorzaakt door het zout <sup>2)</sup>, waarvoor de eene stam gevoeliger is dan de andere. Bij een langzamere groei der boterzuurbacteriën zal de gasvorming zich nog meer tot het midden beperken, omdat het zout dan in dien tijd dieper in de kaasmassa is doorgedrongen. Bij Goudsche kazen blijven vooral de zijkanten zonder gas, tenzij deze dan van uit het midden door den gasdruk gescheurd worden, omdat die gedeelten het hoogste zoutgehalte hebben. Dit laatste is een gevolg van den vorm, welke deze kaassoort heeft.

Door W. VAN DAM en B. J. HOLWERDA zijn onderzoeken verricht, tot dusver nog niet gepubliceerd, over den invloed van den vorm op het zoutgehalte der kaas. Eenige van hunne gegevens stelden zij welwillend te onzer beschikking.

Zij onderzochten kazen in zoo volledig mogelijken bolvorm en in kubusvorm met gelijken inhoud en zoodanig bewerkt, dat het vochtgehalte hetzelfde was, terwijl het pekelen op geheel overeenkomstige wijze geschiedde. Van deze kazen werd dan op gelijke tijden op bepaalde afstanden van de buitenste laag af het zout- en vochtgehalte bepaald.

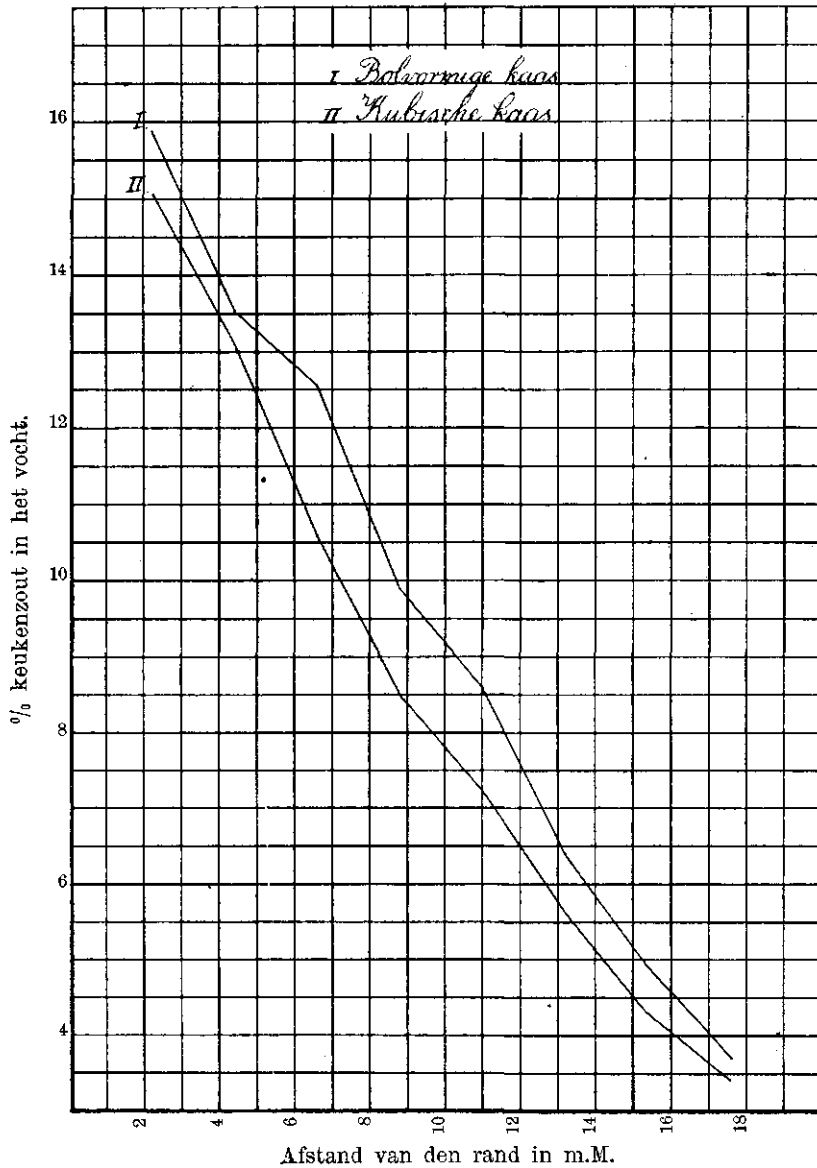
---

1) Dat in de proefkazen het gebrek eerder optrad dan gewoonlijk in de praktijk het geval is, moet daaraan worden toegeschreven, dat de besmetting der kaasmelk met boterzuurbacteriën vergelijkenderwijze vrij hoog was opgevoerd en de virulentie van deze sterk was. Daarbij kwam nog, dat de kazen voortdurend aan een hogere temperatuur waren blootgesteld.

2) Zie Jaarverslag P. Z. B. 1912, bladz. 100.

Onderstaande tabel geeft de getallen daarbij verkregen.

Afstand van den buiten- kant in m.M.	% NaCl in het vocht der bolvormige kaas.	% NaCl in het vocht der kubische kaas.
2.2	15.9	15.1
4.4	13.6	13.1
6.6	12.6	10.6
8.8	9.9	8.5
11.0	8.6	7.1
13.2	6.4	5.6
15.4	4.9	4.3
17.6	3.7	3.4



De grafische voorstelling geeft de curven weer van het verloop der zoutconcentraties en zijn deze verkregen door op den abscis den afstand in mM. van den buitenkant af uit te zetten en op den ordinaat het procentisch zoutgehalte in het vocht. We zien hieruit, dat de curve van het zoutgehalte der bolvormige kaas over de geheele lijn hooger ligt dan die der kubische <sup>1)</sup>. Verder was ook het totale zoutgehalte, op vocht omgerekend, van de bolvormige kaas hooger dan van de kubische kaas, namelijk 5.8 % tegen 4.7 % wat de laatste betrof.

Waar nu de zijkant van Goudsche kaas een bolvorm heeft, zoo kan uit dit onderzoek volgen, dat deze meer zout tot zich neemt dan de vlakke zijden en dus een hoogere zoutconcentratie zal hebben dan het overige gedeelte der kaas. Dit wordt nog bovendien daardoor bevorderd, dat de zouttoetreding aan de zijde uit drie richtingen plaats grijpt.

Zooals we zagen is de zuurgraad van het medium van invloed op de boterzuurgisting. Bij ons kwam daarom de vraag op, of het mogelijk zoude zijn deze uit te schakelen door den zuurgraad der kaas zoo hoog mogelijk op te voeren. Dit kan alleen geschieden door het melksuikergehalte der verse kaasmasa op een maximum te brengen, dus elke watertoevoeging bij de bereiding na te laten en met de onverdunde wei na te warmen. Op deze wijze is dan ook nog eenmaal gekeerd, waarbij hetzelfde boterzuurferment gebruikt werd als bij de kaas van fig. 7. Het resultaat is echter niet bevredigend geweest, want ook hierbij trad de gasontwikkeling op, zij het dan eerst in veel mindere mate. Ze begon na 6 dagen reeds merkbaar te worden en vertoonde de kaas na een paar weken het aspect als de foto aangeeft (zie fig. 13 en 14). De boterzuurfermenten staakten echter hunne werking niet, met het gevolg, dat na een 7-tal weken de duplokaas sterk gerezen was (zie fig. 15 en 16).

Het blijkt dus wel, dat voor dit bijzondere doel het nawarmen met wei niet voldoende is.

Van al onze proef- en contrôlekazen werden nog nagegaan de zuurgraad en de waterstofionenconcentratie.

De eerste werd bepaald door 10 gram kaas in een mortier aan te wrijven met 20 c.c. gedestilleerd water tot een zeer fijne pap en daarna te titreeren met  $\frac{1}{10}$  n loog en phenolphthalein als indicator; dan werd nog 10 c.c.  $\frac{1}{10}$  n loog toegevoegd en teruggetitreerd.

De waterstofionenconcentratie werd electromotorisch gemeten.

Tabel 2 geeft de getallen welke op deze wijze zijn verkregen.

---

1) Bij gelijken inhoud van bol en kubus is de ribbe 1,612 r, zoodat de oppervlakten zich verhouden respectievelijk als 1 tot 1,24. Ondanks het veel grooter oppervlak der kubus is dus de zoutopname door de bolvormige kaas toch nog grooter geweest, iets wat volgens voornoemde onderzoekers misschien in verband staat met de gecompliceerde diffusieverschijnselen bij de ribben.

TABEL II.

Datum van bereiding.	Soort der kaas.	Ouderdom.	Inwendig.		Rand. Titer.
			Titer.	P <sub>H</sub> .	
17-1-1928	proefkaas	14 dagen	12.8	5.57	19.0
Id.	contrôlekaas	id.	19.3	5.22	20.6
15-3-1928	proefkaas	33 dagen	13.2	5.68	21.5
Id.	contrôlekaas	id.	20.5	5.24	21.7
22-3-1928	proefkaas	12 dagen	14.5	5.58	19.7
Id.	contrôlekaas	13 dagen	19.0	5.12	18.0
30-3-1928 met weinagewarmd	proefkaas	19 dagen	12.2	5.61	22.5
Id.	contrôlekaas	id.	21.2	5.06	22.0
Id.	proefkaas	48 dagen	12.5	—	20.0
Id.	contrôlekaas	id.	22.0	—	24.5

Wanneer we de cijfers nader beschouwen dan zien we in de eerste plaats, dat wat het inwendige betreft, er een groot verschil in titer bestaat tusschen de contrôle- en de proefkazen; van deze laatste toch is het belangrijk lager.

De waterstofexponenten zijn daarmee in overeenstemming, deze toch zijn voor de proefkazen hooger, zoodat de waterstofionconcentratie of reële zuurgraad lager is dan voor de contrôlekazen.

Het blijkt dus, dat de boterzuurfermenten, evenals in de lactaatbouillon, ook in kaas een verlaging van den zuurgraad teweeg brengen.

In het randgedeelte, waar de zoutconcentratie de boterzuurgisting in sterke mate belemmerd heeft, is de zuurgraad belangrijk hooger, zoodat een groot verschil bestaat tusschen dat gedeelte en het midden. Ditzelfde verschijnsel zagen we ook bij de twee kazen uit de praktijk (fig. 1 en 2) afkomstig uit Zuidholland, zooals tabel 3 aangeeft.

TABEL III.

Datum van ontvangst.	Ouderdom.	Inwendig.	Rand.
26-4-1928	± 8 weken	11.5	20.0
14-5-1928	± 5 weken	13.5	23.0

Een ander punt van overeenkomst tusschen proef- en praktijkkazen vindt men in de samenstelling van het daarin voorkomend gas.

Van de proefkaas 17-1-'28 en de praktijkkaas, welke ± 8 weken oud was, werd dit verzameld op de wijze als aangegeven in het jaarverslag

P.Z.B. 1909, bladz. 85 en geanalyseerd. Het gas uit de proefkaas, die toen 43 dagen oud was, bestond uit: 42.8 %  $\text{CO}_2$ ; 49.65 %  $\text{H}_2$  en 7.54 %  $\text{N}_2$ ; dat der praktijkkaas uit: 47.9 %  $\text{CO}_2$ ; 48.0 %  $\text{H}_2$  en 3.8 %  $\text{N}_2$ , getallen dus, welke in hetzelfde gebied liggen.

Vatten we nu alle gegevens samen, dan mag in het algemeen gezegd worden, dat het „laat optredend los” bij Goudsche kazen veroorzaakt wordt door boterzuurbacteriën. We zeggen „in het algemeen”, omdat soms de bacteriën van de normale gasvorming in kaas de oorzaak kunnen zijn. Veelvuldig komt dit echter niet voor, daar wij tot dusver slechts éénmaal een dergelijk geval onder handen hebben gehad.

Teneinde het gebrek te voorkomen is het dus voor de praktijk van het grootste belang de besmetting der melk met boterzuurfermenten tegen te gaan. In dit verband wezen we reeds op den invloed, welke uitgaat van voederstoffen, doch behalve dit zijn er nog meerdere factoren, welke ongunstig zijn. Zoo moet o.a. met grooten nadruk gewaarschuwd worden tegen het gebruik van slecht water, waaronder in de eerste plaats het slootwater gerangschikt moet worden. Dat soort water is door zijn aanraking met den grond en doordat er alle mogelijke stoffen in terecht komen, zoo hevig besmet, dat het voor de zuivelbereiding in alle opzichten een gevaar is.

Alvorens te eindigen, wenschen we nog te vermelden, dat B. J. HORWERDA bij dit onderzoek hare medewerking verleende door de waterstofionconcentraties te bepalen.

#### *Plaatverklaring.*

- Fig. 1. Kaas met „laat optredend los” afkomstig uit Zuidholland.
- Fig. 2. Kaas met „laat optredend los” eveneens afkomstig uit Zuidholland.
- Fig. 3. Kaas afkomstig uit Utrecht met vertraagde coligisting.
- Fig. 4. Cultuurplaat op alkalische Löfflersche gelatine van de kaas fig. 3. De groote witte stippen zijn kolonies van bact. coli-commune.
- Fig. 5. Kaas  $4\frac{1}{2}$  maand oud met een groote ronde holte, ontstaan doordat het gas zich daar ter plaatse in groote hoeveelheden heeft afgezet.
- Fig. 6. Kazen bereid op 7 en 9 December 1927 uit melk van koeien gevoerd met ingekuild gras, bewaard bij  $17^{\circ}$ — $18^{\circ}$  C.
- Fig. 7. Proefkaas van 17 Januari 1928, 2 weken oud. Na 8 dagen was hierin geluid opgetreden.
- Fig. 8. Contrôlekaas van 17 Januari 1928, 2 weken oud.
- Fig. 9. Proefkaas van 15 Maart 1928,  $4\frac{1}{2}$  week oud. Hierin was na 13 dagen geluid te bemerken.
- Fig. 10. Contrôlekaas van 15 Maart 1928,  $4\frac{1}{2}$  week oud.
- Fig. 11. Proefkaas van 22 Maart 1928, 11 dagen oud. Reeds na 6 dagen trad hierin geluid op.
- Fig. 11a. Dezelfde kaas 8 dagen oud, om de gescheurde korst te laten zien.
- Fig. 12. Contrôlekaas van 22 Maart 1928, 12 dagen oud.



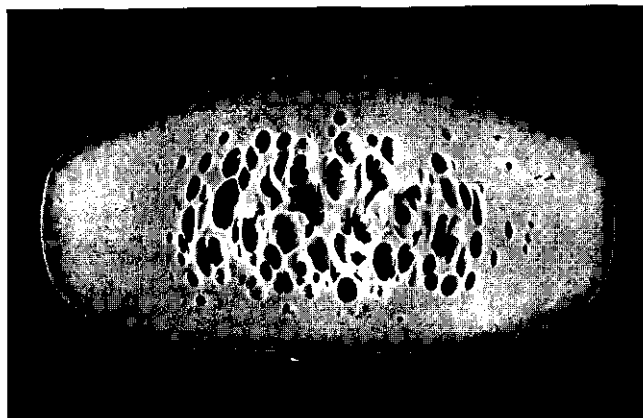


Fig. 1.  
 Laat-los-kaas uit de praktijk.  
 (Zuid-Holland). Ontvangen 26/4 '28.  
 Ouderdom  $\pm$  8 weken.

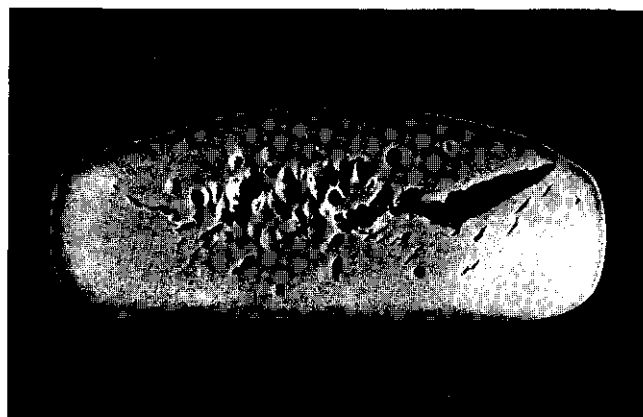


Fig. 2.  
 Laat-los-kaas uit de praktijk.  
 (Zuid-Holland). Ontvangen 1/45 '28.  
 Ouderdom  $\pm$  5 weken.

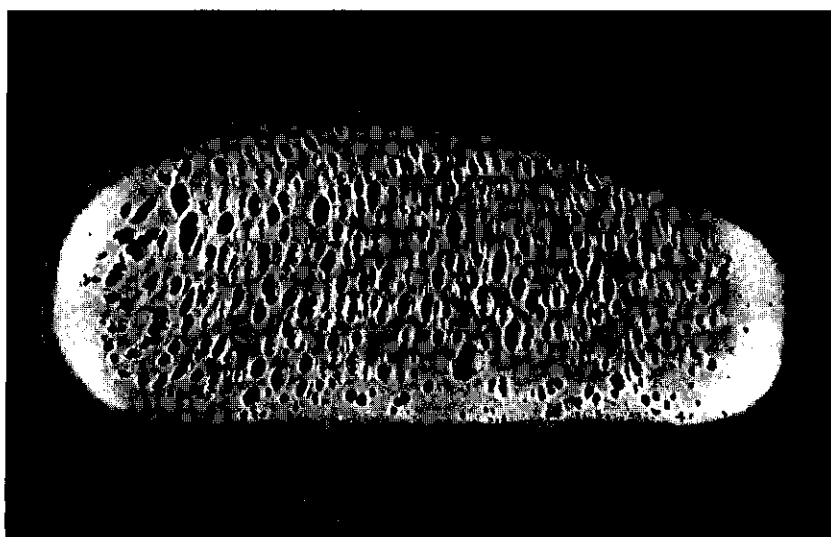


Fig. 3.  
z.g. Laat-loos-kaas uit de praktijk (Utrecht) ontvangen 3/5'28.

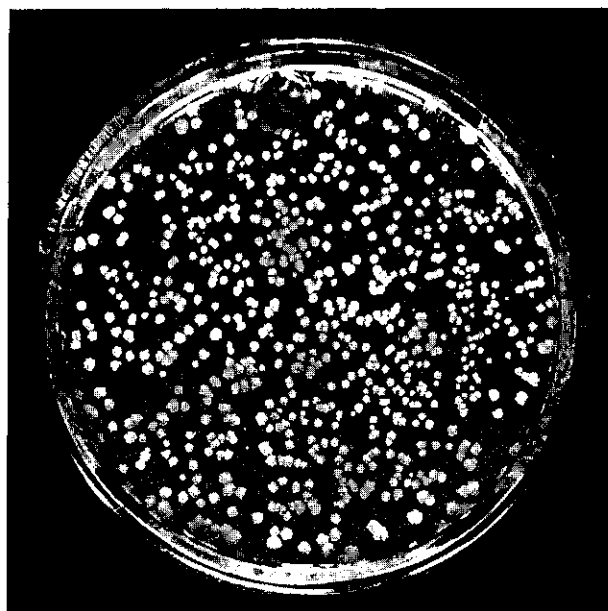


Fig. 4.  
Flora op Löffler-gelatine van de bovenstaande  
z.g. laat-loos-kaas uit de praktijk. (Utrecht).



Fig. 5.

Proefkaas uit boerderijmelk P. Z. B.,  
bereid op 21/3 '28, geënt met boterzuurbact.  
uit kaas.

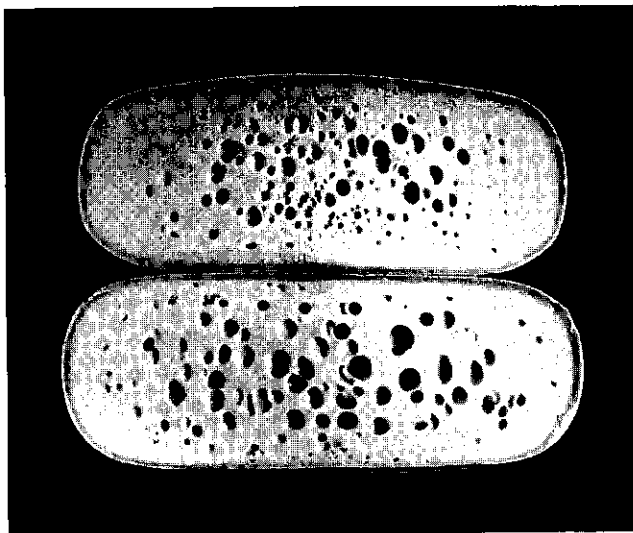


Fig. 6.

Kazen, bereid van melk van koeien, gevoerd met *kuiltgras*.  
Eén ervan 8 dagen bij  $16^{\circ}$  en 14 dagen bij  $17\frac{1}{2}^{\circ}$ ,  
de andere 8 dagen bij lage temperatuur en daarna bij  $17\frac{1}{2}^{\circ}$ .  
Opengesneden 4 weken oud.

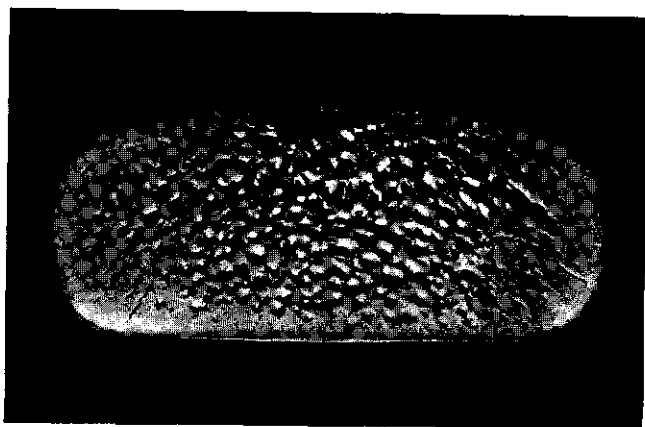


Fig. 7.  
Proefkaas, bereid op 17/1'28 geënt met boterzuurbact.  
uit kaas. Ouderdom 2 weken.

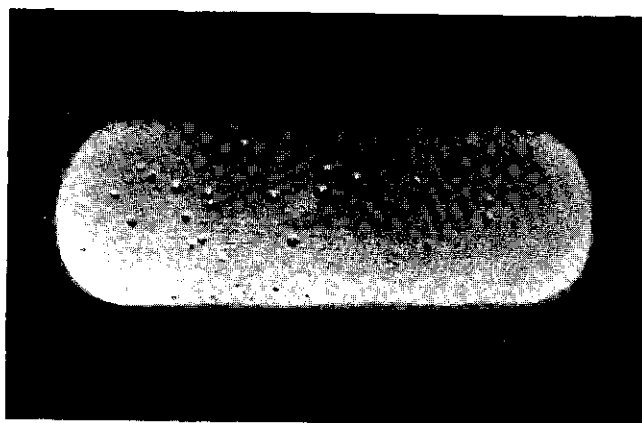


Fig. 8.  
Contrôlekaas, bereid 17/1'28. Ouderdom 2 weken.



Fig. 9.

Proefkaas, bereid op 15.3'28 geënt met boterzuurbact.  
uit kaas. Ouderdom  $4\frac{1}{2}$  week.

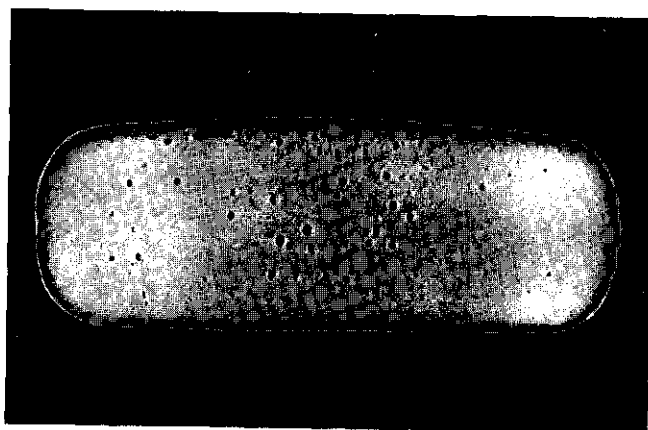


Fig. 10.

Contrôlekaas, bereid op 15.3'28. Ouderdom  $4\frac{1}{2}$  week.

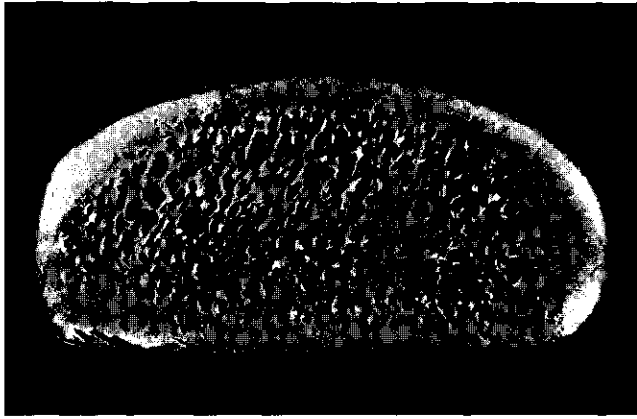


Fig. 11.

Proefkaas, bereid op 22/3'28 geënt met boterzuurbact.  
uit kaas met groot gat. Ouderdom  $\pm$  2 weken.

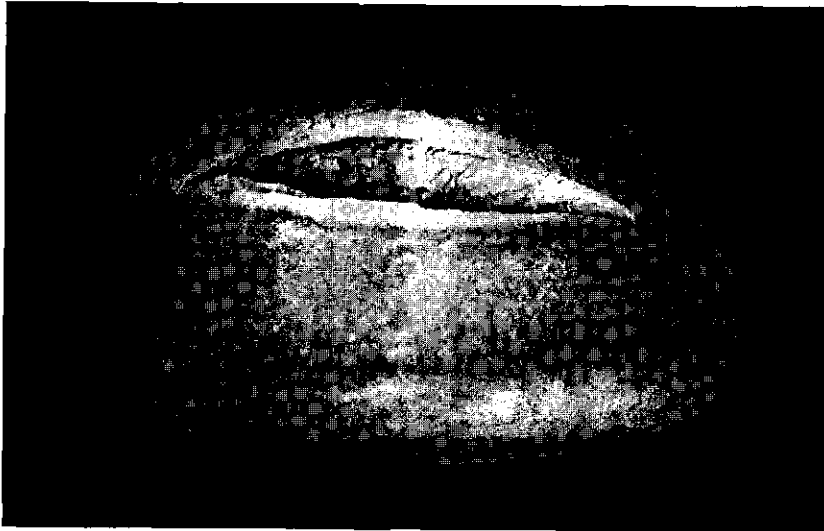


Fig. 11a.

Proefkaas, bereid op 22/3'28 geënt met boterzuurbact.  
uit kaas met groot gat. Gefotografeerd 30/3.

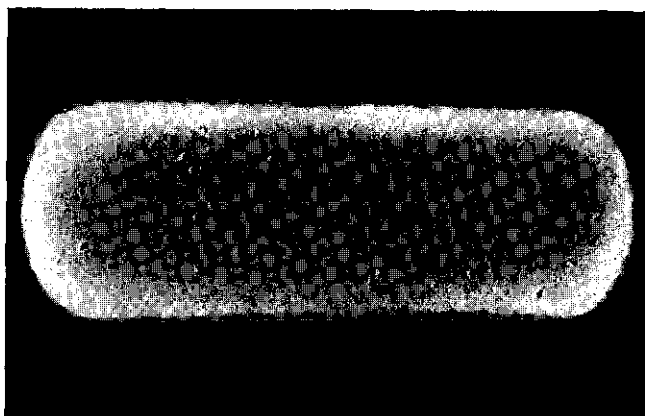


Fig. 12.  
Contrôlekaas, bereid 22/3'28. Ouderdom 2 weken.

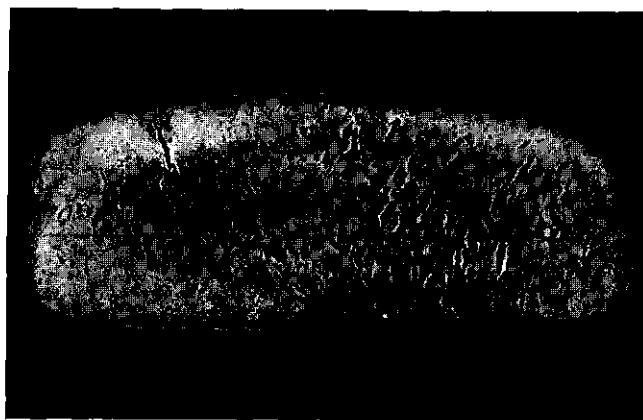


Fig. 13.  
Proefkaas, bereid op 30/3'28 geënt met boterzuurbact.  
uit kaas. Nagewarmd met wei. Ouderdom  
2½ week.

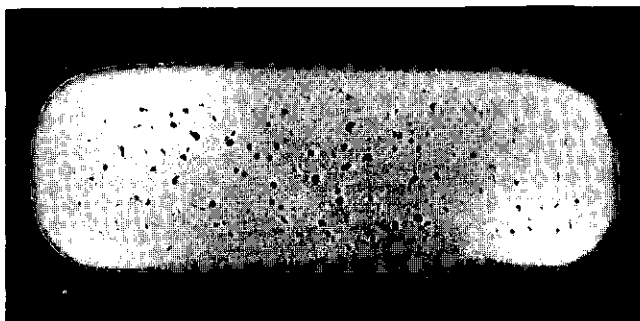


Fig. 14.  
Contrôlekaas, bereid 30/3'28. Nagewarmd met wei.  
Ouderdom  $2\frac{1}{2}$  week.

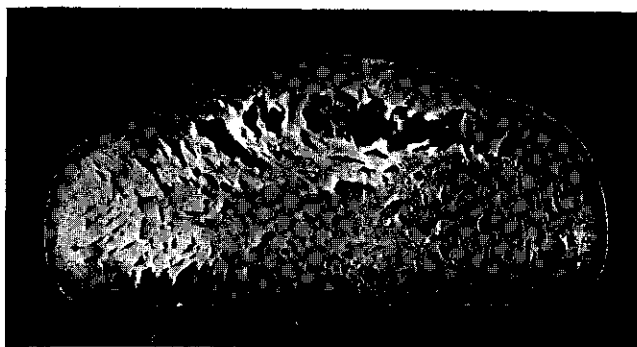


Fig. 15.  
Proefkaas, bereid op 30/3'20 geënt met boterzuurbact.  
uit kaas. Nagewarmd met wei. Ouderdom  
 $\pm 7$  weken.

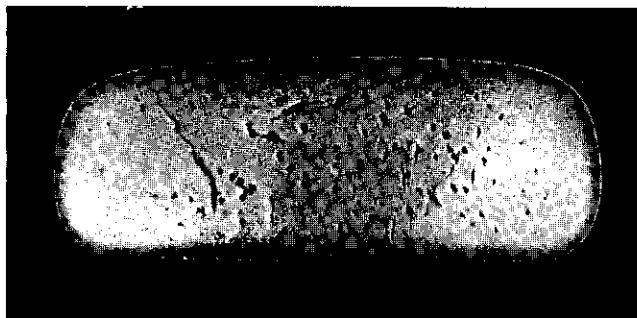


Fig. 16.  
Contrôlekaas, bereid 30/3'28. Ouderdom 7 weken.



- Fig. 13. Proefkaas van 30 Maart 1928, met wei nagewarmd, 2½ week oud. Hierin was na 7 dagen geluid opgetreden. Het randgedeelte was bijna overal kort.
- Fig. 14. Contrôlekaas van 30 Maart 1928 met wei nagewarmd. De zij-kanten waren kort.
- Fig. 15. 2de proefkaas van 30 Maart 1928, 7 weken oud, om de voort-zetting der gasontwikkeling te toonen. De korst was toen gescheurd.
- Fig. 16. 2de contrôlekaas van 30 Maart 1928, 7 weken oud.

### Summary.

#### The subsequent development of gas in Gouda cheese.

In practice the formation of gas in the interior of Gouda cheese later than two weeks after the salting, is called „subsequent blowing” of the cheese. It can be detected by knocking or beating the cheese with the flat hand. Sometimes the flat surfaces become bulged.

In the body of the cheese are observed a greater or smaller number of spherical or irregularly shaped holes. The texture may even become spongy and often the body is ruptured. In rare cases the rind bursts.

The term „subsequent blowing” or „openness” has been given to differentiate it from another defect, the ordinary blowing, caused by *Bact. coli commune* and *Bact. lactis aerogenes*. In few cases this differentiation is imaginary, *viz.* if saltpetre has been used and the gas formation of *Bact. coli* does not begin before the decomposition of this salt, whilst the lacticacid-bacteria are too weak to make all the milksugar disappear during that period.

To point out a better definition it is necessary not only to refer to the time of occurrence, but more especially to take into consideration the chemical and bacteriological features of the defect.

If the lactic-acid-bacteria have done their work well, all the milksugar will have been converted into calciumlactate; which compound is the source of the gas formation. Some years ago OTT DE VRIES and one of the authors described two kinds of organismus, capable of decomposing calciumlactate in cheese; the „butyric acid bacteria” and the „bacteria of the normal gas formation in cheese”. The isolation and properties of both are mentioned in the papers, referred to.

In June 1926 we received two pieces of cheese, which were blown to such degree that the rind had burst. Because of the presence of a great number of spherical holes and the absence of butyric acid-flavor, we assumed it was an infection of „bacteria of the normal gas formation in cheese”, but we were not able to isolate such bacteria. Afterwards it was shown, that we had to do with „butyric acid bacteria”. This conclusion was confirmed with five other cheeses from various origins. An infection of the other kind of bacteria seems

to take place very rarely. We found it in only one cheese, a loaf shaped cheese, made in South-Holland.

As the great importance of the butyric acid bacteria in the practice of Gouda cheesemaking too, was realised, their relations to the nutrient media, not published in earlier papers, were studied.

The best medium for growth and fermentation of these bacteria is Löffler's beef broth with  $\frac{1}{2}$  % galactose, but in cheese the source of carbon consists of calcium lactate, as sugars are not present. For studying the metabolism in cheese a calcium lactate medium would be necessary. In a peptone-calciumlactate-medium however fermentation failed to occur, if inoculated with pure cultures, whereas a fermentation was always observed, if it was inoculated with cheese. It turned out that the combined action of *Bact. coli commune* (or *Bact. lactis aerogenes*), and the butyric acid bacteria caused this phenomenon. Whether it is due to chemical changes of the nitrogenous material by coli or aerogenes has not been shown.

A better result was obtained in using another source of nitrogen, viz. by substituting beef broth for the peptone. So the medium consists of beef broth (with  $\frac{1}{2}$  % sodium-chloride), 2 % calcium lactate and 0.2 % dipotassium phosphate. The precipitation of insoluble calcium phosphates in this medium causes a high acidity, which must be reduced by neutralising.

In regard to the acid-resistance, attention is drawn to the different behaviour of the various strains and to the composition of the medium. The data are given in table I, which may explain the „astonishing” facts in practice, if at the same acidity, one cheese will blow and another remains normal.

The decrease of acidity, often observed in practice with cheese, that have subsequently become blown, can now be easily understood. From table I we conclude a decrease of hydrogen ion-concentration of the calcium lactate medium during growth and apparently this is due to the decomposition of the lactate, which is converted into calcium butyrate and calcium carbonate, the latter neutralising the acids in the culture medium.

In order to prove the above conclusions some series of Gouda cheeses, each cheese weighing 5 Kg., have been made of pure whole milk, obtained by milking the cows with the utmost cleanliness. To be able to compare the influence of the butyric acid bacteria in each series four cheeses were made, two control cheeses and two experiment cheeses, the milk of the latter being inoculated with the butyric acid bacteria. Three strains were used and all caused the particular fault, whereas the control cheeses remained normal.

As a rule the gas is formed in the middle of the cheese; the greater salt concentration at the sides, resulting from the flat shape, prevents the bacteria from making gasholes there.

Further the titratable acidity and the hydrogen ion concentration were determined. In the inoculated cheeses there was a great difference between the acidity of the middle and the sides, in the control-cheeses this difference was not observed or was very small. This gives another proof that the decrease of the acidity in cheese is due to the action of the butyric acid bacteria.

---